

Rec'd PCT/PTO 17 DEC 2004

MODULARIO
L.C.A. - 101



REC'D 07 AUG 2003

Mod. C.E. - 1-4-7

WIPO

PCT

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

N. MI2002 A 001345



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

PCT/IB03/2347

1/3

Roma, li

28 LUG. 2003

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

per IL DIRIGENTE

Paolo / Evans

Dr. Paola Giuliano

BEST AVAILABLE COPY

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A

A. RICHIEDENTE (1)

1) Denominazione ORESTE Pasqua
Residenza MILANO MI codice RSTPON55
2) Denominazione ZOPPETTI Giorgio
Residenza MILANO MI codice ZPPGRG56

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome SANTORO Tiziana (537 BM) ed altri cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza MARIETTI, GISLON e TRUPIANO S.r.l.
via Larga n. 16 città MILANO cap 20122 (prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) _____ gruppo/sottogruppo _____

DERIVATI EPIMERIZZATI DEL POLISACCARIDE K5 A ELEVATISSIMO GRADO DI
SOLFATAZIONE

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome ORESTE Pasqua cognome nome _____
1) ZOPPETTI Giorgio 3) _____
2) _____ 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione _____ tipo di priorità _____ numero di domanda _____ data di deposito _____
1) _____
2) _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

I Titolari partecipano ai diritti sul brevetto nella misura del 50%
ciascuno

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 2 PROV n. pag. 35 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) ...
Doc. 2) 1 PROV n. tav. 1 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) ...
Doc. 3) 1 RIS rich. sost. del richiedente per la concessione del brevetto ...
Doc. 4) 1 RIS designazione inventore ...
Doc. 5) 1 RIS documenti di priorità con traduzione in italiano ...
Doc. 6) 1 RIS autorizzazione o atto di cessione ...
Doc. 7) 1 nominativo completo del richiedente

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

_____ / _____ / _____
_____ / _____ / _____
_____ / _____ / _____
_____ / _____ / _____
confronta singola priorità
_____ / _____ / _____

8) attestati di versamento, totale Euro DUECENTONOVANTUNO/80

obbligatorio

COMPILATO IL 17/05/2002

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Dr. T. Santoro (No. Iscr. 537)CONTINUA SI/NO NODEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SICAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI MILANOMILANOcodice 1515

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI2002A001345

Reg. A.

L'anno DUEMILADUEil giorno ARI EDICIOOTTOdel mese di GIUGNO

Il(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, con tutti i fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

II DEPOSITANTE

UFFICIALE ROGANTE

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

MI2002A 00045

REG. A

DATA DI DEPOSITO

06/2002

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ /

D. TITOLO

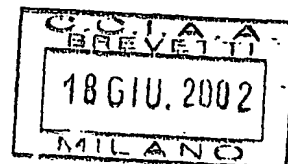
DERIVATI EPIMERIZZATI DEL POLISACCARIDE K5 A ELEVATISSIMO GRADO DI
SOLFATAZIONE

L. RIASSUNTO

Si descrive un nuovo metodo per la supersolfatazione del epiK5-N-solfato per ottenere una epiK5-amina variamente O-supersolfatata con altissimo grado di solfatazione e la trasformazione e l'uso di questi intermedi per la preparazione di nuove epiK5-ammine N-solfatate-O-supersolfatate oppure N-acilate-O-supersolfatate sostanzialmente prive di attività sui parametri della coagulazione e utili in campo cosmetico o farmaceutico.



M. DISEGNO



Descrizione dell'invenzione avente per titolo:

"DERIVATI EPIMERIZZATI DEL POLISACCARIDE K5 A ELEVATISSIMO GRADO DI SOLFATAZIONE"

Titolari: ORESTE, Pasqua; ZOPPETTI, Giorgio; residenti in Milano

Inventori: ORESTE, Pasqua; ZOPPETTI, Giorgio;

OGGETTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione concerne nuovi derivati del polisaccaride K5 ad elevatissimo grado di solfatazione, un procedimento per la loro preparazione, nuovi intermedi altamente O-solfatati utili nella loro sintesi e composizioni farmaceutiche contenenti detti derivati del polisaccaride K5 come principi attivi essenzialmente privi di attività sulla coagulazione.

In particolare, l'invenzione si riferisce a derivati del polisaccaride K5 altamente O- ed N,O-solfatati ottenibili a partire da un polisaccaride K5, previamente N-deacetilato, N-solfatato e C5-epimerizzato per almeno il 20%, mediante O-supersolfatazione in adatte condizioni e successiva N-acilazione o N-solfatazione.

CONTESTO DELL'INVENZIONE

I glicosaminoglicani come eparina, eparan solfato, dermatan solfato, condroitin solfato e acido ialuronico sono biopolimeri estratti industrialmente da vari organi animali.

In particolare, l'eparina, principalmente ottenuta mediante estrazione da mucosa intestinale di maiale o da polmone bovino, è un copolimero polidisperso con una distribuzione di peso molecolare da circa 3.000 a circa 30.000 D formato da una miscela di catene essenzialmente costituite da un acido uronico (acido glucuronico o acido iduronico) e da un aminozucchero (glucosamina) uniti da legami α -1 \rightarrow 4 o β -1 \rightarrow 4.

MI 2002 A 001345

Nell'eparina, l'unità uronica può essere O-solfatata in posizione 2 e l'unità glucosaminica è N-acetilata o N-solfatata, 6-O-solfatata e 3-O-solfatata in circa lo 0,5% delle unità glucosaminiche presenti.

Le proprietà e la naturale biosintesi dell'eparina nei mammiferi sono state descritte da Lindahl e al., 1986 in Lane, D. e Lindahl, U. (Editori) "Heparin. Chemical and Biological Properties; Clinical Applications", Edward Arnold, London, Pagine 159-190, da Lindahl, U, Feingold D. S. e Rodén L, 1986 TIBS, 11, 221-225 e da Conrad H. E. "Heparin Binding Proteins", Capitolo 2: Structure of Heparinoids. Academic Press, 1998. La biosintesi dell'eparina avviene a partire dal suo precursore N-acetil-eparosano costituito da una miscela di catene formate dall'unità disaccaridica ripetitiva glucoronil- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina. Detto precursore subisce modificazioni enzimatiche che idrolizzano parzialmente il gruppo N-acetile, sostituendolo con un gruppo SO_3 , epimerizzano il carbossile in posizione 5 di una parte delle unità glucuroniche trasformandole in unità iduroniche e introducendo gruppi O-solfati per arrivare a un prodotto che, una volta estratto industrialmente, ha un numero di gruppi solfati circa doppio del numero di carbossili per unità disaccaridica. Queste modificazioni enzimatiche conducono, fra l'altro, alla formazione della regione pentasaccaridica di legame all'antitrombina III (ATIII), chiamata pentasaccaride attivo, che è la struttura necessaria per l'elevato legame di affinità dell'eparina all'ATIII e fondamentale per l'attività anticoagulante e antirombotica dell'eparina stessa. Questo pentasaccaride, presente all'interno di sole alcune delle catene che formano l'eparina, contiene un'unità glucosaminica solfatata in posizione 3 e un acido glucuronico intervallato tra disaccaridi contenenti acidi iduronici.

In natura, la formazione del pentasaccaride attivo è resa possibile dalla reazione di epimerizzazione del carbossile di una parte delle unità glucuroniche in unità

iduroniche ad opera della glucoronil-C5-epimerasi (C5-epimerizzazione) e da un'opportuna solfatazione che porta anche all'introduzione di un gruppo solfato sull'ossidrile in posizione 3 della glucosamina. Più particolarmente, in natura la formazione del pentasaccaride attivo è resa possibile dal fatto che la C5-epimerizzazione avviene a grappolo ("cluster" in inglese), vale a dire su porzioni di catene, e in modo estensivo che conduce a un prodotto che contiene più unità iduroniche che glucuroniche. L'eparina commerciale contiene infatti circa il 70% di unità iduroniche e il 30% di unità glucuroniche.

Accanto alle attività principali anticoagulante e antitrombotica, l'eparina esercita anche attività antilipemica, antiproliferativa, antivirale, antitumorale e antimetastatica, ma il suo uso come farmaco è ostacolato dagli effetti secondari dovuti all'azione anticoagulante che può provocare emorragie.

STATO DELLA TECNICA

E' noto che il polisaccaride capsulare K5 isolato da *Escherichia coli*, descritto da Vann W. F. et al., in European Journal of Biochemistry, 1981, 116, 359-364 ("Vann 1981"), è costituito da una miscela di catene formate dall'unità disaccaridica ripetitiva glucoronil- β -1 \rightarrow 4-N-acetil glucosamina e mostra dunque la stessa sequenza dell'N-acetil-eparosano precursore dell'eparina. Il polisaccaride capsulare K5, indicato qui di seguito "polisaccaride K5" o più semplicemente "K5", è stato modificato per via chimica da Lormeau et al. come descritto in US 5,550,116 e da Casu et al. come descritto in Carbohydrate Research, 1994, 263, 271-284. K5-O-solfati aventi attività antitumorale, antimetastatica, antivirale, in particolare anti-HIV sono descritti in EP 333243 e WO 98/34958. Il K5 è stato anche modificato per via chimica e enzimatica al fine di ottenere prodotti aventi un'attività biologica in vitro sulla coagulazione dello stesso tipo di quella dell'eparina così come estratta da organi animali (eparina



estrattiva).

L'ottenimento dei prodotti aventi un'attività sulla coagulazione dello stesso tipo di quella dell'eparina estrattiva avviene mediante procedimenti che mimano quello che avviene in natura e prevedono tutti il passaggio chiave di C5-epimerizzazione con D-glucuronil C5 epimerasi.

I procedimenti descritti in IT 1230785, WO 92/17507, WO 96/14425 e WO 97/43317 utilizzano il K5 come materiale di partenza. Il K5 proveniente da fermentazione è sottoposto a una N-deacetilazione seguita da N-solfatazione e sul K5-N-solfato così ottenuto è effettuata una C5-epimerizzazione con C5-epimerasi in soluzione, ottenuta o per cromatografia di una soluzione di enzimi microsomiali da mastocitoma di topo (IT 1230 785) oppure da fegato bovino (WO 92/17507, WO 96/14425 e WO 97/43317).

La D-glucuronil C5 epimerasi da fegato bovino è stata purificata da Campbell, P. et al. in J. Biol. Chem., 1994, 269/43, 26953-26958 ("Campbell 1994") che hanno anche fornito la sua composizione in aminoacidi e descritto il suo uso in soluzione per la trasformazione di un K5-N- solfato nel corrispondente prodotto epimerizzato al 30%, dimostrando la formazione di acido iduronico mediante metodo HPLC seguente ad una depolimerizzazione nitrosa totale fino a disaccaride.

Il documento WO 98/48006 descrive la sequenza del DNA che codifica la D-glucuronil C5 epimerasi e una D-glucuronil C5 epimerasi ricombinante, ottenuta da un vettore di espressione ricombinante contenente detto DNA, successivamente purificata da Campbell et al. come illustrato da Jin-Ping L. et al. in J. Biol Chem. 2001, 276, 20069-20077 ("Jin-Ping 2001").

La sequenza completa della C5-epimerasi è stata descritta da Crawford B. E. et al. in J. Biol. Chem., 2001, 276(24), 21538-21543 (Crawford 2001)

Il documento WO 01/72848 descrive un metodo per la preparazione di derivati N-deacetilati N-solfati del polisaccaride K5, epimerizzati almeno al 40% di acido iduronico rispetto al totale degli acidi uronici, aventi un peso molecolare da 2.000 a 30.000, contenenti dal 25 al 50% di catene ad alta affinità per l'ATIII e aventi un'attività anticoagulante e antitrombotica espressa come rapporto HCII/antiXa da 1,5 a 4. Detto documento descrive la supersolfatazione di un K5-N-solfato epimerizzato al 40-60% e indica che il prodotto ottenuto, di cui è riportato il ^{13}C -RMN, ha un contenuto di gruppi solfati per unità disaccaridica di 2-3,5. Ripetendo la suddetta supersolfatazione nelle condizioni descritte e esaminando il ^{13}C -RMN si è constatato che il prodotto ottenuto è effettivamente un'ammina libera il cui contenuto di 6-O-solfato è 80-95%, quello di 3-O-solfato sull'amminozucchero è del 30%, ma il cui grado di solfatazione è di 3,2. Si è inoltre constatato che nelle condizioni di supersolfatazione descritte in WO 01/72848 non si ottiene un grado di solfatazione più alto di 3,2.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

E' stato ora trovato che, a partire da un epiK5-N-solfato, è possibile ottenere una epiK5-amina-O-solfatata con un grado di solfatazione maggiore di quello di epiK5-amine-O-solfato descritte in letteratura, per esempio in WO 01/72848, preparando il sale con una base organica terziaria o quaternaria di detto epiK5-N-solfato avendo cura di lasciare la miscela di reazione a sé per un periodo di tempo 30-60 minuti mantenendo il pH a circa 7 e trattando poi il sale ottenuto con un reattivo di O-solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione. Analogamente, è stato trovato che, sottoponendo un LMW-epiK5-N-solfato allo stesso metodo di salificazione e di O-supersolfatazione, si ottiene un LMW-epiK5-amina altamente O-supersolfatata.

E' stato inoltre trovato che, sottoponendo l'epiK5-amina-O-supersolfatata o la LMW-epiK5-amina-O-supersolfatata a una N-acilazione o a una N-solfatazione, si

ottengono nuovi derivati N-acilati o N-solfatati e O-supersolfatati privi di attività sulla coagulazione e utili per la preparazione di composizioni farmaceutiche o cosmetiche.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

Al fine di uniformare la terminologia e rendere il testo più comprensibile, nella presente descrizione si useranno termini o espressioni convenzionali, al singolare o al plurale. In particolare:

- con "K5" o "polisaccaride K5" si intende il polisaccaride capsulare da *Escherichia coli* ottenuto per fermentazione: vale a dire una miscela di catene costituite da unità disaccaridiche di acido glucuronico-N-acetilglucosamina ripetitive eventualmente contenenti un doppio legame all'estremità non riducente come sopra illustrato, comunque preparato e purificato secondo i metodi descritti in letteratura, in particolare secondo Vann 1981, secondo Manzoni M. et al., Journal of Bioactive Compatible Polymers, 1996, 11, 301-311 ("Manzoni 1996"), secondo il metodo descritto in WO 01/72848 o come descritto nella PREPARAZIONE I qui di seguito;
- con "C5-epimerasi" si intende la D-glucoronil C-5 epimerasi, estrattiva o ricombinante, comunque preparata, isolata e purificata, in particolare come descritto in Campbell 1994, in WO 98/48006, in Jin-Ping L. et al. in J. Biol Chem. 2001, 276, 20069-20077 (Jin-Ping 2001") o in Crawford 2001;
- con "K5-amina" si intende il K5 N-deacetilato per almeno il 95%;
- con "K5-N-solfato" si intende il K5 N-deacetilato e N-solfato per almeno il 95%, come descritto qui di seguito;
- con "epiK5" si intende il K5 e i suoi derivati in cui il 20-60% delle unità

glucuroniche è C5-epimerizzato a unità iduroniche

- con "epiK5-N-solfato" si intende il K5-N-solfato in cui il 20-60% delle unità glucuroniche è C5-epimerizzato a unità iduroniche del tipo di quelli descritti in WO 92/17507 o WO 01/72848;
- con "epiK5-amina-O-supersolfatata" si intende una epiK5-amina-O-solfatata con un grado di solfatazione di almeno 3,4;
- con "N-acil-epiK5-amina-O-supersolfatato" si intende un'epiK5-amina-O-supersolfatata N-acilata, con un grado di solfatazione di almeno 3,4;
- con "epiK5-N-solfato-O-supersolfatato" si intende un epiK5-N,O-solfato con un grado di solfatazione di almeno 4;

Inoltre:

- i termini e espressioni convenzionali qui sopra definiti si riferiscono a K5 così come isolati dopo fermentazione, generalmente con una distribuzione di pesi molecolari da circa 1.500 a circa 50.000 con un peso molecolare medio di 10.000- 25.000, vantaggiosamente di 15.000- 25.000;
- i termini e espressioni convenzionali qui sopra definiti, quando preceduti dall'acronimo "LMW" (dall'inglese "low molecular weight", basso peso molecolare), per esempio LMW-K5-N-solfato, LMW-epiK5-N-solfato designano prodotti a basso peso molecolare, ottenuti per frazionamento o per depolimerizzazione;
- i termini e espressioni convenzionali come qui sopra definiti, quando sono seguiti da "-derivato" designano globalmente tanto i derivati da K5 nativo che quelli a basso peso molecolare;
- salvo specifica, diversa indicazione, con "grado di solfatazione" si



intende il rapporto SO_3/COO^- , esprimibile anche come numero di gruppi solfato per unità disaccaridica, misurato con il metodo conduttimetrico descritto da Casu B. et al. in Carbohydrate Research, 1975, 39, 168-176 (Casu 1975), lo stesso utilizzato in WO 01/72848;

- con "condizioni di O-supersolfatazione" si intende una O-solfatazione spinta effettuata per esempio secondo il Metodo C descritto da B. Casu et al. in Carbohydrate Research, 1994, 263, 271-284 (Casu 1994);
- con il termine "alchile" si intende un alchile lineare o ramificato, mentre con "tetrabutylammonio" si intende indicare il gruppo ammonio sostituito con quattro gruppi *n*-butile.

Così, secondo uno dei suoi aspetti, la presente invenzione fornisce nuovi derivati N-deacetilati del polisaccaride K5, O-solfatati e N-solfatati o N-acilati con un acido (C_2 - C_4)carbossilico, C5-epimerizzati a acido iduronico in almeno il 20% del totale delle unità uroniche, aventi un peso molecolare medio da circa 2.000 a circa 45.000, un grado di solfatazione di almeno 3,4 per i derivati N-acilati o di almeno 4 per i derivati N-solfati, detti derivati essendo sostanzialmente inattivi sui parametri della coagulazione.

In analogia con quanto sopra premesso, detti nuovi derivati saranno qui di seguito globalmente indicati con il termine generale "epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati N-sostituiti", indipendentemente dal loro peso molecolare.

In particolare, il peso molecolare medio è tra circa 2000 a circa 45.000 in quanto detti derivati provengono o da un epi-K5-N-solfato ottenuto per N-deacetilazione e N-solfatazione del K5 da fermentazione oppure dalla depolimerizzazione nitrosa di quest'ultimo. Controllando detta depolimerizzazione nitrosa è possibile ottenere derivati a basso peso molecolare praticamente in tutto il suddetto intervallo. Tuttavia, per l'uso dei derivati della presente invenzione come prodotti farmaceutici o cosmetici è

vantaggioso disporre di derivati a basso peso molecolare, con un peso molecolare medio tra circa 4.500 e circa 8.500, con una distribuzione di peso molecolare da circa 2.000 a circa 10.000 o di derivati ad alto peso molecolare, provenienti dal K5 non frazionato, con un peso molecolare medio tra circa 20.000 e circa 45.000, con una distribuzione di pesi molecolari da circa 2.000 a circa 70.000.

Il grado di solfatazione degli epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati N-sostituiti della presente invenzione è molto elevato, in quanto sui 4 ossidrili liberi disponibili per unità disaccaridica, almeno 3,4, preferibilmente da 3,5 a 3,8, risultano solfati, mentre l'azoto della glucosamina è acilato o anch'esso solfato preferibilmente al 100%, nel qual caso il grado di solfatazione diventa preferibilmente da 4 a 4,6.

I nuovi epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati N-sostituiti dell'invenzione sono 100% 6-O-solfati e 50-80% 3-O-solfati nelle loro unità glucosaminiche, 5-10% 3-O-monosolfati in unità glucuroniche, 10-15% 3-O-monosolfati in unità iduroniche e 2,3-di-O-solfati nelle rimanenti unità uroniche, tenendo conto che il grado di solfatazione è di almeno 3,4 nel caso di derivati N-acilati e di almeno 4 nel caso di derivati N-solfati.

Gli epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati N-sostituiti della presente invenzione vengono preparati a partire da un polisaccaride K5, previamente N-deacetilato, N-solfato preferibilmente al 100%, C5-epimerizzato al 20-60% e eventualmente depolimerizzato con acido nitroso, avente un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 25.000. Preferibilmente, come materiale di partenza si impiega un epi-K5-N-solfato avente un peso molecolare medio tra 10.000 e 25.000 o un LMW-epiK5-N-solfato avente un peso molecolare medio tra circa 1.500 e circa 8.000.

Gli epiK5-N-solfati, preparati per C5-epimerizzazione di K5-N-solfati, sono ben noti in letteratura e ampiamente descritti per esempio in WO 92/17507 o in WO

01/72848.

Un LMWepiK5-N-solfato avente un contenuto in unità iduroniche di circa 20%, ottenuto per N-deacetilazione, N-solfatazione e C5-epimerizzazione di una frazione di K5 avente un peso molecolare medio di 5.000 è descritto in WO 92/17507.

Un epiK5-N-solfato particolarmente vantaggioso come materiale di partenza è quello ottenuto per epimerizzazione di un K5-N-solfato praticamente privo di gruppi acetile a sua volta preparato da K5 particolarmente puro, in particolare non contenente sostanze lipofile, descritto nella domanda pendente IT MI2001A00397.

I K5-N-solfati C5-epimerizzati a basso peso molecolare aventi un più alto contenuto di unità iduroniche, in particolare 40-60%, preferibilmente 50-55%, sono invece nuovi prodotti particolarmente vantaggiosi come materiali di partenza nella preparazione degli epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati N-sostituiti della presente invenzione.

I LMW-epiK5-N-solfati come sopra illustrati vengono preparati mediante un procedimento caratterizzato dal fatto che si sottopone un K5-N-solfato, in un qualsiasi ordine,

- (i) a una C5-epimerizzazione con una D-glucuronil C5-epimerasi isolata, purificata e immobilizzata su un supporto solido, a un pH di circa 7, a una temperatura di circa 30°C e per un periodo di tempo di 12-24 ore in presenza di almeno uno ione bivalente scelto tra calcio, magnesio, bario e manganese; e
- (ii) a una depolimerizzazione nitrosa eventualmente seguita da una riduzione con boroidruro di sodio.

La C5-epimerasi, preferibilmente ricombinante, isolata e purificata per esempio secondo Campbell 1994, WO 98/48006, Jin-Ping 2001 o Crawford 2001, viene

immobilizzata su un supporto inerte in presenza del substrato, vale a dire in presenza del K5-N-solfato-derivato di partenza. L'immobilizzazione viene effettuata secondo i metodi convenzionali, per esempio come descritto in WO 01/72848.

La reazione di C-5epimerizzazione viene condotta facendo ricircolare 20-1.000 ml di una soluzione di HEPES 25 mM a pH circa 7 contenente 0,001-10 g di K5-N-solfato-derivato e un catione scelto tra calcio, magnesio, bario e manganese a una concentrazione tra 10 e 60 mM attraverso una colonna contenente da $1,2 \times 10^7$ a 3×10^{11} cpm dell'enzima immobilizzato, mantenendo il pH a circa 7 a circa 30°C, a un flusso di 30-220 ml/ora per un periodo di tempo di 12-24 ore, vantaggiosamente di 15-24 ore.

Preferibilmente si fa ricircolare detta soluzione a un flusso di circa 200 ml/ora per tutta una notte (15-20 ore). Il prodotto ottenuto è purificato e separato secondo metodi noti, per esempio mediante ultrafiltrazione e precipitazione con etanolo. Il prodotto così ottenuto è costituito o da epiK5-N-solfato (e in tal caso viene disciolto in acqua e sottoposto a depolimerizzazione) oppure da LMW-epiK5-N-solfato (in tal caso costituisce il prodotto finale). La percentuale di epimerizzazione, in pratica la quantità di unità iduroniche rispetto alle glucuroniche, è calcolata con $^1\text{H-RMN}$ secondo il metodo descritto in WO 96/4425.

La reazione di depolimerizzazione nitrosa è condotta secondo i metodi noti per la depolimerizzazione dell'eparina, per esempio secondo il metodo descritto in EP 37319, in WO 82/03627 oppure secondo il metodo per la depolimerizzazione di un K5-N-solfato descritto in EP 544592, ma a partire da un K5-N-solfato o da un epiK5-N-solfato contenente da 0 a non più del 10% di gruppi acetile. Preferibilmente, la depolimerizzazione, effettuata con nitrito sodico e acido cloridrico, è seguita da una riduzione *in situ* con boroidruro di sodio.



In pratica, una soluzione acquosa fredda del substrato (K5-N-solfato o epiK5-N-solfato) viene portata a pH acido (circa 2) con acido cloridrico e, sempre a freddo, trattata con nitrito sodico mantenendo la temperatura (circa 4°C) e il pH (circa 2) costanti e, al termine della depolimerizzazione (circa 15 - 30 minuti) la soluzione viene neutralizzata con idrossido di sodio e trattata, sempre a circa 4°C con una soluzione acquosa di boroidruo di sodio. Al termine della riduzione (circa 4 ore) l'eccesso di boroidruo di sodio è distrutto con acido cloridrico, la soluzione è neutralizzata con idrossido di sodio e il prodotto depolimerizzato (e ridotto) viene isolato secondo metodi noti, per esempio per semplice precipitazione con etanolo o acetone. Il prodotto ottenuto al termine della depolimerizzazione può essere o un LMW-epiK5-N-solfato (in tal caso costituisce il prodotto finale) oppure un LMW-K5-N-solfato (e in tal caso viene direttamente sottoposto a C5-epimerizzazione come illustrato qui sopra, dopo isolamento o anche in soluzione senza essere preventivamente isolato). Controllando opportunamente la reazione di depolimerizzazione, in particolare utilizzando diverse quantità di nitrito sodico/acido cloridrico, si ottengono LMW-K5-N-solfati o LMW-epiK5-N-solfati aventi un peso molecolare medio in tutto l'intervallo da circa 1.500 a circa 7.500, calcolato allo spettro ^{13}C -RMN attraverso l'integrazione del segnale attribuito al C2 del 2,5-anidromannitolo con quella del carbonio anomero della glucosamina interna alla catena polisaccaridica.

Gli epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati N-sostituiti della presente invenzione sono preparati secondo un nuovo procedimento che costituisce un aspetto ulteriore della presente invenzione. Detto procedimento è caratterizzato dal fatto che

- (a) si tratta un polisaccaride K5, previamente N-deacetilato, N-solfatato preferibilmente al 100%, C5-epimerizzato al 20-60% e eventualmente depolimerizzato con acido nitroso, avente un peso molecolare medio tra

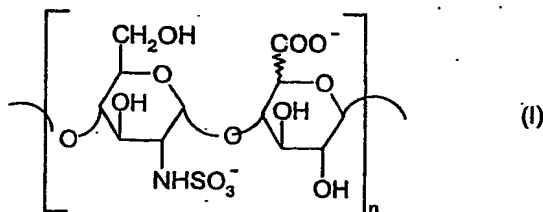
circa 1.500 e circa 25.000, in forma acida, con una base organica terziaria o quaternaria, lasciando la miscela di reazione a sé per un periodo di tempo di 30-60 minuti, mantenendo il pH della soluzione a un valore di 7 e si isola il suo sale con detta base organica;

- (b) si tratta detto sale di base organica di detto polisaccaride con un reattivo di O-solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione;
- (c) si tratta il prodotto così ottenuto con un reattivo di N-solfatazione o con un derivato funzionale di un acido carbossilico (C_2-C_4), si isola l'epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-sostituito così ottenuto sotto forma di sale di sodio e eventualmente si trasforma detto sale di sodio in un altro sale chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

In questo contesto, il termine "chimicamente accettabile" è riferito a un catione utile nelle sintesi chimiche, come gli ioni sodio, ammonio, (C_1-C_4)tetraalchilammonio, o per la purificazione del prodotto, mentre "farmaceuticamente accettabile" si spiega da sé.

Cationi vantaggiosi sono quelli derivati da metalli alcalini, metalli alcalino-terrosi, ammonio, (C_1-C_4)tetraalchilammonio, alluminio e zinco. Cationi preferiti sono gli ioni sodio, calcio e tetrabutylammonio.

Vantaggiosamente, i materiali di partenza nella preparazione degli epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati N-sostituiti della presente invenzione sono epiK5-N-solfato-derivati costituiti da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula I



in cui le unità uroniche sono costituite per il 20-60% da acido iduronico, n è un numero intero da 3 a 100 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

Più vantaggiosamente, detti epiK5-N-solfato-derivati di partenza sono costituiti da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula I in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60% da acido iduronico, n è un numero intero da 3 a 100 e il corrispondente catione è chimicamente accettabile.

Materiali di partenza preferiti sono LMW-epiK5-N-solfati come sopra illustrati, costituiti da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula I in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60%, preferibilmente 50-55%, da acido iduronico, n è un numero intero da 3 a 15 e il corrispondente catione è chimicamente accettabile.

Detti materiali di partenza sono preferibilmente utilizzati sotto forma di sale di sodio, a meno che non sia già disponibile un sale con una base organica terziaria o quaternaria preparato secondo il passaggio (a) sopra illustrato, preferibilmente il sale di tetrabutylammonio.

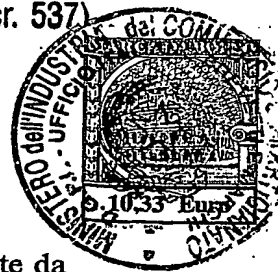
Secondo un modo di procedere vantaggioso, il passaggio (a) viene condotto facendo passare una soluzione del sale di sodio del polisaccaride K5, previamente N-deacetilato, N-solfatato preferibilmente al 100%, C5-epimerizzato al 20-60% e eventualmente depolimerizzato con acido nitroso, avente un peso molecolare medio da

circa 1.500 a circa 25.000, attraverso una resina a scambio ionico acida, per esempio del tipo IR-120 H^+ , raccogliendo l'eluato comprendente anche le acque di lavaggio della resina e neutralizzando l'eluato con una base organica terziaria o quaternaria, preferibilmente con una soluzione acquosa di idrossido di tetrabutylammonio. La soluzione viene lasciata a sé per 1 ora, mantenendo il suo pH a 7 mediante aggiunta della stessa base e il sale così ottenuto viene isolato mediante liofilizzazione.

Nel passaggio (b), la O-supersolfatazione avviene utilizzando un eccesso di agente O-solfatante e operando a una temperatura da 20 a 70°C per un periodo di tempo fino a 24 ore in un solvente aprotico polare.

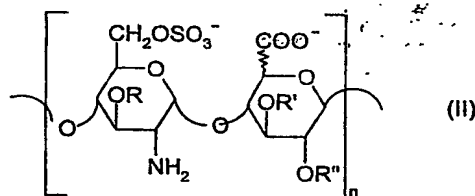
Vantaggiosamente, il sale con una base organica terziaria o quaternaria del polisaccaride K5, previamente N-deacetilato, N-solfatato preferibilmente al 100%, C5-epimerizzato al 20-60% e eventualmente depolimerizzato con acido nitroso, avente un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 25.000 così come isolato nel passaggio (a), viene disciolto in dimetilformamide e trattato con 2 - 10 moli di un reattivo di O-solfatazione per ogni ossidrile libero a una temperatura di 40-60°C per 10-20 ore. Come reattivo di O-solfatazione viene vantaggiosamente usato l'addotto piridina. SO_3 in quantità di 2,5 - 5 moli, preferibilmente 2,5 - 4 moli per ossidrile libero per disaccaride e la reazione viene vantaggiosamente condotta a 50-60°C, preferibilmente a 55°C per una notte. Il prodotto ottenuto al termine della reazione è isolato per addizione di 0,1-1 volume di acqua e neutralizzazione, preferibilmente con idrossido di sodio, precipitazione con una soluzione satura di cloruro sodico in acetone e filtrazione e eventuale ultrafiltrazione.

Il prodotto così ottenuto è il sale di sodio di un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato il cui contenuto in acido iduronico è il 20-60% del totale degli acidi uronici, avente un peso molecolare medio da circa 4.500 a circa 40.000 e un grado di



solfoazione di almeno 3,4, vantaggiosamente di almeno 3,5, più vantaggiosamente da 3,55 a 4, preferibilmente da 3,55 a 3,8. Il sale sodico così ottenuto può essere convertito in un altro sale. A titolo di esempio si può effettuare uno scambio con lo ione calcio operando con membrane da ultrafiltrazione.

Come vantaggiosi materiali di partenza del passaggio (a) si usano epiK5 -N-solfato-derivati costituiti da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula I suddetta, in cui le unità uroniche sono costituite per il 20-60% da acido iduronico, n è un numero intero da 3 a 100 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile. In tal caso, alla fine del passaggio (b) si ottiene un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato costituito da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula II



in cui le unità uroniche sono costituite per il 20-60% da acido iduronico, n è un numero intero da 3 a 100, R, R' e R'' sono idrogeno o SO_3^- , il grado di solfoazione è di almeno 3,4, vantaggiosamente di almeno 3,5, più vantaggiosamente da 3,55 a 4, preferibilmente da 3,55 a 3,8 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

Questi epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati a elevatissimo grado di solfoazione sono nuovi prodotti utili come intermedi nella preparazione dei loro derivati N-solfati o N-(C₂-C₄)acilati sostanzialmente privi di attività sui parametri della coagulazione, ma dotati di altre interessanti proprietà farmacologiche.

Vantaggiosi epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati a elevatissimo grado di

solfatazione sono formati da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula II in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60% da acido iduronico, n è un numero intero da 3 a 100, con un peso molecolare medio da circa 2.000 a circa 40.000, R è almeno 40%, preferibilmente 50-80% SO_3^- , R' e R'' sono ambedue SO_3^- oppure uno è idrogeno e l'altro è 5-10% SO_3^- in acido glucuronico monosolfato e 10-15% SO_3^- in acido iduronico monosolfato, il grado di solfatazione è superiore a 3,4 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

EpiK5-amina-O-supersolfatata-derivati a elevatissimo grado di solfatazione preferiti sono LMW-epiK5-amine-O-supersolfatate formate da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula II in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60%, preferibilmente 50-55%, da acido iduronico, R è almeno 40%, vantaggiosamente 50-80%, preferibilmente circa 65% SO_3^- , R' e R'' sono ambedue SO_3^- oppure uno è idrogeno e l'altro è 5-10% SO_3^- in acido glucuronico e 10-15% SO_3^- in acido iduronico, n è un numero intero da 3 a 15, con un peso molecolare medio da circa 4.000 a circa 8.000 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

Tutti questi epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati ad altissimo grado di solfatazione sono nuovi prodotti che sono utili intermedi per la preparazione dei nuovi epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati N-sostituiti e costituiscono dunque un ulteriore aspetto della presente invenzione.

In, particolare, secondo un altro suo aspetto, l'invenzione concerne l'uso dei suddetti epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati ad altissimo grado di solfatazione per la preparazione di nuovi epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati N-sostituiti, in particolare N-solfatati o N-acilati.

Nel passaggio (c), l'epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato ad altissimo grado di solfatazione viene N-acilato o N-solfatato utilizzando i noti metodi di letteratura.

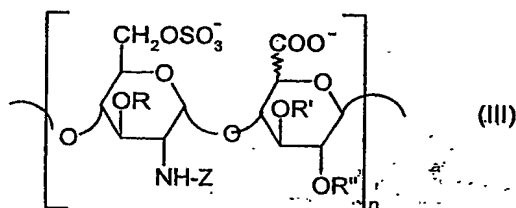
La N-solfatazione viene effettuata trattando una soluzione acquosa contenente l'epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato proveniente dal passaggio (b) con carbonato sodico e un agente di N-solfatazione, per esempio un addotto (C₁-C₄)trialchilammina.SO₃ o piridina.SO₃, mantenendo la miscela a 30-50°C per 8-24 ore e isolando l'epiK5-N solfato-O-supersolfatato-derivato desiderato, per esempio mediante diafiltrazione.

La N-acilazione viene effettuata facendo reagire l'epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato proveniente dal passaggio (c) con un derivato funzionale di un acido mono o dicarbossilico contenente da 2 a 4 atomi di carbonio in soluzione idroalcolica a una temperatura di circa 4°C. Come derivati funzionali di detti acidi (C₂-C₄)carbossilici, preferibilmente dell'acido acetico, malonico, o succinico o dei mono esteri di questi ultimi, si può usare l'anidride, il cloruro, un'anidride mista o un estere attivo. Il prodotto ottenuto, un N-(C₂-C₄)acil-epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato, viene neutralizzata con una base, preferibilmente idrossido di sodio, e quindi isolata per ultrafiltrazione e precipitazione con una soluzione satura di cloruro sodico in acetone. Se necessario il passaggio di N- solfatazione o N-acilazione vengono ottenuti fino ad ottenere una sostituzione superiore al 95%.

I nuovi epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati N-sostituiti così ottenuti si presentano generalmente sotto forma del loro sale sodico. Detto sale sodico può essere convertito in un altro sale chimicamente o farmaceuticamente accettabile. Sali particolarmente vantaggiosi sono quelli di metalli alcalini, alcalino-terrosi, di ammonio, (C₁-C₄)tetraalchilammonio, alluminio e zinco. Preferiti sono i sali di sodio, calcio e tetrabutylammonio.

Vantaggiosi epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati N-sostituiti secondo la presente invenzione sono ottenuti attraverso epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati a loro volta preparati da epiK5-N-solfato-derivati costituiti da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula I suddetta, in cui le unità uroniche sono costituite per il 20-60% da acido iduronico, n è un numero intero da 3 a 100 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

In tal caso, i nuovi epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati N-sostituiti sono costituiti da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula III



in cui R', R'' e n hanno il significato sopra definito, R è SO₃⁻ in almeno 40% di detta miscela di catene, Z è un (C₂-C₄)acile o un gruppo SO₃⁻, il grado di solfatazione è almeno 3,4 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

Detti cationi sono vantaggiosamente quelli di metalli alcalini, alcalino-terrosi, di ammonio, (C₁-C₄)tetraalchilammonio, alluminio e zinco e, tra questi, preferibilmente i sali di sodio, calcio e tetrabutylammonio.

Il (C₂-C₄)acile preferito è il gruppo acetile. Z è 100% SO₃⁻ o (C₂-C₄)acile.

Tra i suddetti nuovi epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati N-sostituiti, quelli costituiti da miscele di catene in cui almeno 90% di dette catene ha la formula III suddetta in cui R è SO₃⁻ nel 50%-80%, preferibilmente in circa il 65% di dette catene e il grado di solfatazione è superiore a 3,4, vantaggiosamente è di 3,55-4,6, preferibilmente di 3,55-4,3.

Sarà chiaro all'esperto del ramo che il suddetto grado di solfatazione dipende dal



significato di Z nella formula III in quanto, se questo è acile, il valore massimo possibile del grado di solfatazione della miscela di catene è 4, mentre se esso è SO_3^- il suo valore massimo possibile è 5.

Vantaggiosi epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati-N-sostituiti sono formati da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula III in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60% da acido iduronico, n è un numero intero da 3 a 100, con un peso molecolare medio da circa 4.500 a circa 40.000, R è almeno 40%, preferibilmente 50-80% SO_3^- , R' e R'' sono ambedue SO_3^- oppure uno è idrogeno e l'altro è 5-10% SO_3^- in acido glucuronico monosolfato e 10-15% SO_3^- in acido iduronico monosolfato, Z è 100% SO_3^- o $(\text{C}_2\text{-C}_4)\text{acile}$, il grado di solfatazione è superiore a 3,4 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

EpiK5-amina-O-supersolfatata-derivati N-sostituiti preferiti sono LMW-epiK5-amine-O-supersolfatate formate da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula III in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60%, preferibilmente 50-55%, da acido iduronico, R è almeno 40%, vantaggiosamente 50-80%, preferibilmente circa 65% SO_3^- , R' e R'' sono ambedue SO_3^- oppure uno è idrogeno e l'altro è 5-10% SO_3^- in acido glucuronico e 10-15% SO_3^- in acido iduronico, Z è 100% SO_3^- o $(\text{C}_2\text{-C}_4)\text{acile}$, n è un numero intero da 3 a 15, con un peso molecolare medio da circa 4.000 a circa 8.500 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

I nuovi epiK5-amina-O-supersolfatata-derivati N-sostituiti, specialmente sotto forma dei loro sali, sono prodotti altamente anionici in grado di catturare i radicali liberi e sono utilizzabili nell'industria cosmetica come coadiuvanti contro la caduta dei capelli o per preparare creme "anti-età" e, nell'industria farmaceutica, come prodotti per

trattamento di dermatiti.

Così, secondo un suo aspetto ulteriore, la presente invenzione fornisce composizioni farmaceutiche comprendenti, in qualità di un loro principio attivo, una quantità farmacologicamente attiva di un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-sostituito come sopra illustrato o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, in miscela con un eccipiente farmaceutico.

Nelle composizioni farmaceutiche della presente invenzione per la somministrazione orale, sottocutanea, endovenosa, transdermica o topica, i principi attivi sono preferibilmente somministrati sotto forma di unità di dosaggio, in miscela con i classici eccipienti o veicoli farmaceutici.

La posologia può variare ampiamente in funzione dell'età, del peso, e delle condizioni di salute del paziente. Questa posologia comprende la somministrazione di una dose da 1 a 1000 mg, vantaggiosamente da 10 a 750 mg, preferibilmente 250 a 500 mg da una a tre volte al giorno per via endovenosa, sottocutanea, orale, transdermica o topica.

Infine, secondo un altro dei suoi aspetti, la presente invenzione fornisce una composizione cosmetica comprendente una quantità efficace di un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-sostituito o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in miscela con un eccipiente cosmetico.

Un sale scelto dal gruppo consistente nei sali di sodio, potassio, calcio, magnesio, alluminio e zinco costituisce valido principio attivo delle composizioni della presente invenzione.

I seguenti esempi illustrano l'invenzione senza tuttavia limitarla.

PREPARAZIONE I

Preparazione del polisaccaride K5 da Escherichia coli

Viene dapprima eseguita una fermentazione in beuta utilizzando il seguente medium:

Farina di soia degrassata	2 g/l
K ₂ HPO ₄	9,7 g/l
KH ₂ PO ₄	2 g/l
MgCl ₂	0,11 g/l
Sodio citrato	0,5 g/l
Ammonio solfato	1 g/l
Glucosio	2 g/l
Acqua di fonte	1000 ml
pH = 7,3	

Il medium viene sterilizzato a 120°C per 20 minuti. Il glucosio viene preparato separatamente in forma di soluzione che viene sterilizzata a 120°C per 30 minuti e addizionata sterilmente al medium. La beuta viene inoculata con una sospensione di cellule di E. coli Bi 8337/41 (O10:K5:H4) proveniente da uno slant tenuto in Tryptic soy agar, e incubata a 37°C per 24 ore sotto agitazione controllata (160 rpm, 6 cm di corsa). La crescita batterica si misura contando le cellule con il microscopio. In un'operazione successiva, un fermentatore Chemap-Braun da 14 l contenente lo stesso medium di cui sopra, viene inoculato allo 0,1% con la coltura della beuta di cui sopra e si effettua la fermentazione mediante aerazione di 1 vvm, (vvm = volume di aria per volume di liquido per minuto) agitazione 400 rpm e temperatura di 37°C per 18 ore. Durante la fermentazione vengono misurati il pH, l'ossigeno, il glucosio residuo, il polisaccaride K5 prodotto e la crescita batterica. Alla fine della fermentazione la temperatura viene portata a 80°C per 10 minuti. Le cellule vengono separate dal medium tramite

centrifugazione a 10.000 rpm e il surnatante viene ultrafiltrato usando un modulo SS 316 (MST) equipaggiato con membrane PES con cut-off nominale di 800 e 10.000 D per ridurre il volume a 1/5. Il polisaccaride K5 viene quindi precipitato mediante addizione di 4 volumi di acetone a 4°C e lasciato a sedimentare per una notte a 4°C. Infine viene recuperato mediante centrifugazione a 10.000 rpm per 20 minuti o filtrazione. Si esegue poi la deproteinizzazione del solido ottenuto utilizzando una proteasi di tipo II da *Aspergillus oryzae* in tampone di NaCl 0,1 M e EDTA 0,15 M a pH 8 contenente SDS (sodio dodecil solfato) allo 0,5% (10 mg/l di filtrato) a 37°C per 90 minuti. La soluzione ottenuta viene ultrafiltrata su modello SS 316 con membrane a cut-off nominale di 10.000 D con 2 estrazioni con NaCl 1M e lavata con acqua fino a scomparsa dell'assorbanza nell'ultrafiltrato. Il polisaccaride K5 viene quindi precipitato con acetone e si ottiene una resa di 850 mg per litro di fermentatore. La purezza del polisaccaride ottenuto viene misurata tramite la determinazione degli acidi uronici (metodo al carbazolo), NMR al protone e al carbonio 13, UV e contenuto di proteine. La purezza risulta maggiore dell' 80%.

Il polisaccaride ottenuto è composto da due frazioni a diverso peso molecolare, rispettivamente 30.000 e 5.000 D come risulta dalla determinazione mediante HPLC impiegando una colonna Pharmacia 75 HR e una frazione singola con un tempo di ritenzione di circa 9 minuti usando due colonne in serie di Bio-sil SEC 250 (Bio Rad) e Na₂SO₄ come fase mobile a temperatura ambiente e flusso di 0,5 ml/minuti. La misura viene effettuata contro una curva standard ottenuta con frazioni di eparina a peso molecolare noto.

Lo spettro ¹H- RMN del K5 purificato così ottenuto mostra diversi segnali attribuibili a metili di sostanze lipofile.

PREPARAZIONE II



Purificazione del K5

In 100 ml di una soluzione acquosa satura di cloruro di sodio e termostata a 4°C viene sciolto 1 g del K5 ottenuto alla fine della PREPARAZIONE I e alla soluzione così ottenuta vengono addizionati 3 volumi di isopropanolo freddo. La concentrazione salina della soluzione viene portata a 3 M mediante aggiunta della quantità calcolata di una soluzione satura di cloruro sodico e si lascia la soluzione ottenuta in ambiente freddo (circa 4°C) per una notte. Il precipitato formatosi viene separato mediante centrifugazione a 10.000 rpm per 20 minuti e la purezza del prodotto viene controllata mediante dialisi per una notte e successivo esame dello spettro $^1\text{H-RMN}$, da cui devono essere assenti segnali nella regione sotto 1,5 ppm. Se necessario, l'operazione di dissoluzione in acqua satura di NaCl e precipitazione con isopropanolo viene ripetuta. Il precipitato viene sciolto in acqua e ultrafiltrato su membrana Miniplat Millipore cut off 10.000 D fino a scomparsa dei sali. Si ottiene così un K5 avente una purezza di almeno 99% dal cui spettro $^1\text{H-RMN}$ non risulta alcuna traccia di impurezze lipofile nella regione sotto 1,5 ppm.

PREPARAZIONE III

Preparazione di un K5-N- solfato

(i) N-Deacetilazione

Dieci grammi di polisaccaride K5 puro preparato come descritto nella PREPARAZIONE II vengono disciolti in 1000 ml di sodio idrossido 2N e la soluzione così preparata viene lasciata a 60 °C per 24 ore. La soluzione viene portata a temperatura ambiente quindi a pH neutro (pH7) con acido cloridrico 6N.

(ii) N-solfatazione

Alla soluzione contenente il K5 deacetilato, mantenuta a 40 °C, vengono aggiunti 16 g di sodio carbonato e successivamente e in 4 ore, 16 g di piridina. SO_3^- .

Alla fine della reazione, dopo 24 ore, la soluzione viene portata a temperatura ambiente, poi a pH 7,5-8 con una soluzione al 5% di acido cloridrico. Il prodotto viene purificato dai sali mediante diafiltrazione usando una membrana a spirale avvolta da 1.000 D (prepscale cartridge-Millipore). Il processo viene terminato quando la conducibilità del permeato è inferiore a 1000 μ S, preferibilmente inferiore a 100 μ S. L'intradialisi si riduce fino ad ottenere una concentrazione del polisaccaride del 10% usando lo stesso sistema da dialisi in concentrazione. La soluzione concentrata viene essiccata mediante liofilizzazione. All'analisi dello spettro ^{13}C -RMN non appaiono N-acetili o NH_2 residui.

PREPARAZIONE IV

Preparazione di un epiK5-N-solfato

Una soluzione di 10 g del K5-N-solfato ottenuto come descritto nella PREPARAZIONE III in 600 ml di tampone HEPES 25 mM a pH 7, contenente CaCl_2 a una concentrazione 50 mM viene fatta ricircolare attraverso una colonna da 50 ml caricata con resina Sepharose 4B contenente 5 g di C5-epimerasi ricombinante (WO 96/14425) immobilizzata come descritto in WO 01/72848. La reazione è condotta a 30°C a pH 7 con un flusso di 200 ml/h per 24 ore. Il prodotto ottenuto viene purificato mediante ultrafiltrazione e precipitazione con etanolo. Si ottiene così un epiK5-N-solfato il cui contenuto in acido iduronico è del 54%.

PREPARAZIONE V

Preparazione di un LMW-epiK5-N-solfato

1 g di prodotto ottenuto nel passaggio (a) viene depolimerizzato mediante il metodo di degradazione con acido nitroso e seguente riduzione dell'aldeide formatasi. In particolare si procede sciogliendo il prodotto in 25 ml di acqua distillata e addizionandolo con 230 mg di sodio nitrito disciolti in 115 ml di acqua distillata. La

soluzione viene quindi portata a 4°C e il pH a 2 con HCl 0,1 N e mantenuto per 30 minuti. A fine reazione la soluzione viene portata a temperatura ambiente e il pH a 7 con NaOH 0,1 M. La soluzione viene quindi addizionata con 450 mg. di NaBH₄ e lasciata reagire per 4 ore. Il prodotto viene recuperato tramite precipitazione con 3 volumi di acetone a 4°C, filtrazione con imbuto filtrante e essiccamento a 40° C in stufa a vuoto. Si ottengono 900 mg di LMW-epiK5-N-solfato con una distribuzione di pesi molecolari misurata con metodo HPLC che va da 1.000 a 4.000.

ESEMPIO 1

EpiK5-amina-O-supersolfatata-N-solfato

(a) *Sale di tetrabutylammonio dell'epi K5-N-solfato*

Una soluzione di 400 mg di epiK5-N-solfato in 40 ml di acqua viene termostata a 4°C, quindi passata su resina a scambio ionico IR 120⁺ preconditionata con acqua a 4°C. L'eluato ottenuto, consistente in 100 ml di una soluzione a pH 1,94, viene neutralizzato con una soluzione di idrossido di tetrabutylammonio al 15% e lasciato a temperatura ambiente per un'ora, mantenendo il pH a 7 mediante aggiunta di idrossido di tetrabutylammonio al 15% e infine viene liofilizzato. Si ottengono così 805 mg di sale di tetrabutylammonio di epiK5-N-solfato.

(b) *Epi-K5-amina-O-supersolfatata*

Una soluzione contenente gli 805 mg del sale così ottenuto in 30 ml di dimetilformamide viene posta a 55°C e trattata con 30 ml di dimetilformamide contenente 2,26 g di addotto piridina.SO₃. La reazione a 55°C viene continuata per tutta la notte poi alla miscela sono aggiunti 60 ml di acqua. Dopo neutralizzazione con NaOH 1N, il prodotto è precipitato con 3 volumi di acetone saturo di NaCl e posto a 4°C per una notte. Il precipitato è recuperato per filtrazione su guch G4 e quindi ultrafiltrato con sistema Millipore TFF da 1000 D e seccato a pressione ridotta. Si ottengono 550 mg di

epi-K5-amina-O-supersolfatata avente un contenuto di acido iduronico del 54%, di glucosamina-6-O-solfato del 100%, di glucosamina 3-O-solfato del 60%, di acido glucuronico monosolfato del 10%, di acido iduronico monosolfato del 15%, il resto delle unità uroniche essendo disolfatato, con un grado di solfatazione di 3,55 misurato con metodo conduttimetrico secondo Casu et al 1975.

(c) *EpiK5-amina-O-supersolfatata-N-solfato*

A una soluzione di 250 mg della epi-K5-amina-O-supersolfatata ottenuta nel passaggio (b) in 15 ml di acqua vengono aggiunti 400 mg di carbonato sodico, poi alla miscela così ottenuta vengono aggiunti 400 mg di addotto piridina.SO₃ in forma solida poco per volta in 4 ore. La miscela di reazione viene tenuta a 55°C per tutta la notte, quindi viene fermata portando il pH a 7 con HCl 0,1N. Dopo ultrafiltrazione su membrana da 1000 D vengono aggiunti 3 volumi di acetone saturo di cloruro sodico e il precipitato è recuperato per centrifugazione a 5000 rpm per 5'. Si ottengono così 244 mg di epiK5-amina-O-supersolfatata-N-solfato il cui contenuto in acido iduronico è del 54%, in 6-O-solfato del 100%, in N-solfato del 100%, in glucosamina 3-O-solfato del 60%, in acido glucuronico monosolfato del 10%, in acido iduronico monosolfato del 15%, il resto delle unità uroniche essendo disolfatato, e il cui grado di solfatazione è 4,25 misurato con metodo conduttimetrico secondo Casu et al 1975.

ESEMPIO 2

N-Acetil-epiK5-amina-O-supersolfatata

Una soluzione di 250 mg di epi-K5-amina-O-supersolfatata ottenuta nel passaggio (b) dell'Esempio 1 in 75 ml di acqua e raffreddata a 4°C sono aggiunti 7,5 ml di metanolo e 3,75 ml di anidride acetica. La reazione è mantenuta a 4°C per 2 ore mantenendo il pH a un valore di 7 con NaOH 5M. Dopo ultrafiltrazione su membrana da 1.000 D sono aggiunti 3 volumi di acetone saturo di cloruro sodico e il precipitato è

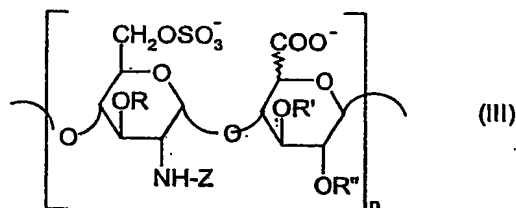


recuperato per centrifugazione a 5.000 rpm per 5'. Si ottengono così 249 mg di N-acetil-epiK5-amina-O-supersolfatata il cui contenuto in acido iduronico è del 54%, in glucosamina-6-O-solfato del 100%, in N-acetile del 100%, in glucosamina 3-O-solfato del 60%, in acido glucuronico monosolfato del 10%, in acido iduronico monosolfato del 15%, il resto delle unità uroniche essendo disolfatato, e il cui grado di solfatazione è 3,5 misurato con metodo conduttimetrico secondo Casu et al 1975.

RIVENDICAZIONI

1. Un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-solfato o N-acilato con un acido (C₂-C₄)carbossilico, avente un contenuto in acido iduronico del 20-60%, un peso molecolare medio da circa 2.000 a circa 45.000 e un grado di solfatazione di almeno 3,4 detto derivato essendo sostanzialmente inattivo sui parametri della coagulazione.
2. Un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-solfato o N-acilato secondo la rivendicazione 1, il cui peso molecolare medio è tra circa 15.000 e circa 45.000.
3. Un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-solfato o N-acilato secondo la rivendicazione 1, il cui peso molecolare medio è tra circa 4.500 e circa 8.500.
4. Un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-solfato secondo una delle rivendicazioni 1-3, caratterizzato dal fatto che detto grado di solfatazione è da 4 a 4,6.
5. Un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-acilato secondo una delle rivendicazioni 1-3, caratterizzato dal fatto che detto grado di solfatazione è da 3,4 a 3,8.
6. Un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-solfato secondo una delle rivendicazioni 1-4, caratterizzato dal fatto di essere 100% 6-O-solfatato e 50-80% 3-O-solfatato nelle sue unità glucosaminiche, 5-10% O- monosolfatato in unità glucuroniche, 10-15% 3-O-monosolfatato in unità iduroniche e 2,3-di-O-solfatato nelle rimanenti unità uroniche.
7. Un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-acilato secondo una delle rivendicazioni 1-3 e 5, caratterizzato dal fatto di essere 100% 6-O-solfatato e 50-80% 3-O-solfatato nelle sue unità glucosaminiche, 5-10% O-monosolfatato in unità glucuroniche, 10-15% O-monosolfatato in unità iduroniche e 2,3-di-O-solfatato nelle rimanenti unità uroniche.
8. Un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-solfato o N-acilato secondo una delle rivendicazioni 1-7, caratterizzato dal fatto di essere costituito da una miscela di

catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula III



in cui le unità uroniche sono costituite per il 20-60% da acido iduronico, R, R', R'' rappresentano idrogeno o SO₃⁻, R essendo SO₃⁻ in almeno 40% di detta miscela di catene, Z è un (C₂-C₄)acile o un gruppo SO₃⁻, n è un numero intero da 3 a 100, il grado di solfatazione è almeno 3,4 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

9. Un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-solfato o N-acilato secondo la rivendicazione 8 caratterizzato dal fatto che detto catione è scelto tra quelli di metalli alcalini, alcalino-terrosi, di ammonio, (C₁-C₄)tetraalchilammonio, alluminio e zinco.

10. Un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-solfato o N-acilato secondo la rivendicazione 9 caratterizzato dal fatto che detto catione è scelto tra quelli del sodio, calcio e tetrabutylammonio.

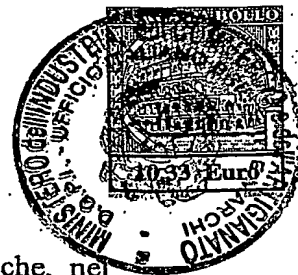
11. Un epiK5-amina-O-supersolfatata N-solfato o N-acilato secondo una delle rivendicazioni 8-10, caratterizzato dal fatto di essere costituito da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula III in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60% da acido iduronico, n è un numero intero da 3 a 100, con un peso molecolare medio da circa 2.000 a circa 40.000, R è 50-80% SO₃⁻, R' e R'' sono ambedue SO₃⁻ oppure uno è idrogeno e l'altro è 5-10% SO₃⁻ in acido glucuronico monosolfato e 10-15% SO₃⁻ in acido iduronico monosolfato, Z è 100% SO₃⁻ o (C₂-C₄)acile, il grado di solfatazione è superiore a 3,4 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

12. Un epiK5-amina-O-supersolfatata N-solfato o N-acilato secondo una delle rivendicazioni 8-10, caratterizzato dal fatto di essere costituito da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula III in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60%, preferibilmente 50-55%, da acido iduronico, R è 50-80% SO_3^- , R' e R'' sono ambedue SO_3^- oppure uno è idrogeno e l'altro è 5-10% SO_3^- in acido glucuronico e 10-15% SO_3^- in acido iduronico, Z è 100% SO_3^- o (C2-C4)acile, n è un numero intero da 3 a 15, con un peso molecolare medio da circa 4.000 a circa 8.500 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

13. Procedimento per la preparazione di un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-solfato o N-acilato secondo una delle rivendicazioni 1-12, caratterizzato dal fatto che

- (a) si tratta un polisaccaride K5, previamente N-deacetilato, N-solfato, C5-epimerizzato al 20-60% e eventualmente depolimerizzato con acido nitroso, avente un peso molecolare medio tra circa 1.500 e circa 25.000, in forma acida, con una base organica terziaria o quaternaria, lasciando la miscela di reazione a sé per un periodo di tempo di 30-60 minuti a pH circa 7 e si isola il suo sale con detta base organica;
- (b) si tratta detto sale di base organica di detto polisaccaride con un reattivo di O-solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione;
- (c) si tratta un sale di una base organica terziaria o quaternaria del prodotto così ottenuto con un reattivo di N-solfatazione o con un derivato funzionale di un acido carbossilico ($\text{C}_1\text{-C}_4$), si isola l'epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-sostituito così ottenuto.

14. Procedimento secondo la rivendicazione 13, caratterizzato dal fatto che detto epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-sostituito così ottenuto è isolato sotto forma di sale di sodio e eventualmente trasformato in un altro sale chimicamente o

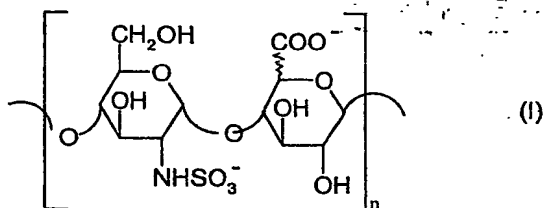


farmaceuticamente accettabile.

15. Procedimento secondo la rivendicazione 14, caratterizzato dal fatto che, nel passaggio (a) si usa l'idrossido di tetrabutylammonio in qualità di base organica terziaria o quaternaria.

16. Procedimento secondo una delle rivendicazioni 13-15, caratterizzato dal fatto che, nel passaggio (b) la O-supersolfatazione è condotta in dimetilformamide utilizzando 2-4 moli di reattivo di O-solfatazione per OH disponibile per disaccaride a una temperatura di 40-60°C per 15-20 ore.

17. Procedimento secondo una delle rivendicazioni 13-16, caratterizzato dal fatto che come materiale di partenza si usa un epiK5-N-solfato-derivato costituito da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula I



in cui le unità uroniche sono costituite per il 20-60% da acido iduronico, n è un numero intero da 3 a 100 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

18. Procedimento secondo la rivendicazione 17, caratterizzato dal fatto che detto materiale di partenza è costituito da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula I, in cui n è come definito nella rivendicazione 17 e le unità uroniche sono costituite per il 40-60% da acido iduronico.

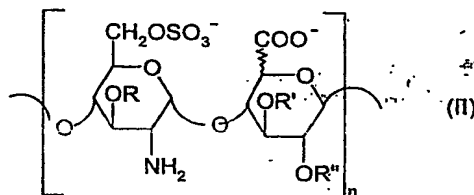
19. Procedimento secondo una delle rivendicazioni 17 e 18, caratterizzato dal fatto che detto materiale di partenza è costituito da una miscela di catene in cui almeno il

90% di dette catene ha la formula I, in cui n è un numero intero da 3 a 15.

20. Procedimento secondo una delle rivendicazioni 17 a 18, caratterizzato dal fatto che detto materiale di partenza proviene da una N-deacetilazione e da una N-solfatazione di un K5 sostanzialmente privo di sostanze lipofile.

21. Un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato il cui contenuto in acido iduronico è il 20-60% del totale degli acidi uronici, avente un peso molecolare medio da circa 2.000 a circa 40.000 e un grado di solfatazione di almeno 3,4.

22. Un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato secondo la rivendicazione 21, caratterizzato dal fatto che detto epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato è costituito da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula II



in cui le unità uroniche sono costituite per il 20-60% da acido iduronico, n è un numero intero da 3 a 100, R , R' e R'' sono idrogeno o SO_3^- , il grado di solfatazione è almeno 3,4 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

23. Un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato secondo la rivendicazione 22, caratterizzato dal fatto che detto grado di solfatazione è da 3,55 a 3,8.

24. Un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato secondo la rivendicazione 22 o 23, caratterizzato dal fatto di essere costituita da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula II in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60% da acido iduronico, n è un numero intero da 3 a 100, con un peso molecolare medio da circa 2.000 a circa 40.000, R è 50-80% SO_3^- , R' e R'' sono ambedue SO_3^- oppure uno è idrogeno e l'altro è 5-10% SO_3^- in acido glucuronico monosolfato e 10-15% SO_3^- in

acido iduronico monosolfato, il grado di solfatazione è superiore a 3,4 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

25. Una composizione farmaceutica comprendente, in qualità di un suo principio attivo, una quantità farmacologicamente attiva di un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-sostituito secondo una delle rivendicazioni da 1 a 12 in miscela con un eccipiente farmaceutico.

26. Una composizione cosmetica comprendente una quantità efficace di un epiK5-amina-O-supersolfatata-derivato N-sostituito secondo una delle rivendicazioni da 1 a 12, in miscela con un eccipiente cosmetico.

Dr. T. Santoro (No. Iscr. 537)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.